

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年6月3日 (03.06.2004)

PCT

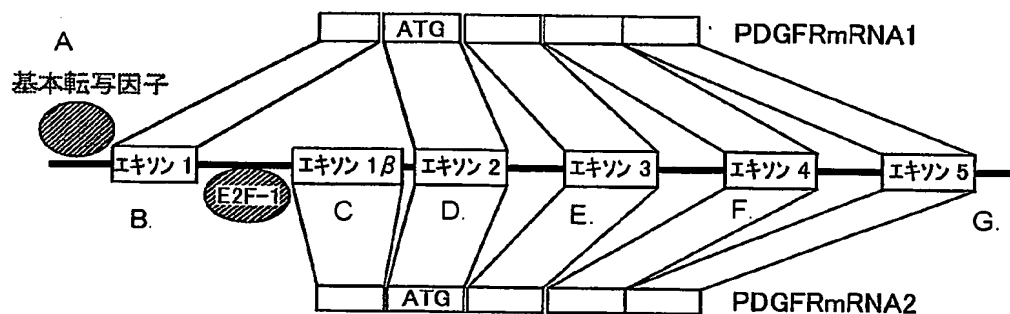
(10) 国際公開番号
WO 2004/046356 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, (72) 発明者; および
A61K 31/7088, 48/00, A61P 35/00, 43/00 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井本 正哉 (IMOTO, Masaya) [JP/JP]; 〒223-8522 神奈川県 横浜市 港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 湊 雄介 (MINATO, Yusuke) [JP/JP]; 〒223-8522 神奈川県 横浜市 港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 田代 悦 (TASHIRO, Etsu) [JP/JP]; 〒223-8522 神奈川県 横浜市 港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014528
- (22) 国際出願日: 2003年11月14日 (14.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2002-332142
2002年11月15日 (15.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人 (ISSHIKI & CO.); 〒105-0004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: EXON 1 β OF PDGF RECEPTOR α GENE AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: PDGF受容体 α 遺伝子のエクソン1 β 及びその利用



A...BASIC TRANSCRIPTION FACTOR
B...EXON 1
C...EXON 1 β
D...EXON 2
E...EXON 3
F...EXON 4
G...EXON 5

(57) Abstract: Using an antisense nucleotide, a ribozyme, a maxyline or an RNAi constructed based on the base sequence of exon 1 β of a PDGF receptor α gene, which is expressed in specific cancer cells, or a polypeptide fragment thereof, the translation of an mRNA transcribed from the exon 1 β of the PDGF receptor α gene is inhibited. An expression inhibitor having as the active ingredient a substance inhibiting expression (for example, the antisense nucleotide, ribozyme, maxyline or an RNAi as described above) is efficacious as a remedy for cancer.

[続葉有]



LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,

TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 特定の癌細胞において発現するPDGF受容体 α 遺伝子のエクソン1 β の塩基配列、又はその一部のポリペプチドを基に作製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNA iを用いて、PDGF受容体 α 遺伝子のエクソン1 β から転写されるmRNAの翻訳を抑制する。また、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又はRNA iなどの発現抑制物質を有効成分とする発現抑制剤は、癌の治療剤として有効である。

明 細 書

P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β 及びその利用

5 関連文献とのクロスリファレンス

本願は、2002年11月15日に出願した特願2002-332142号に基づく優先権を主張する。その文献をこの明細書中に援用する。

10 技術分野

本発明は、P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β 又はその一部を有するポリヌクレオチド、並びに P D G F 受容体 α 遺伝子の m R N A のうちエキソン 1 β を含む m R N A を標的とする P D G F 受容体 α の発現抑制方法、発現抑制物質、及び発現抑制剤、
15 並びに癌の治療剤に関する。

背景技術

血小板由来増殖因子 (P D G F) は、細胞の増殖や発生・分化、創傷治癒、さらには癌悪性化や動脈硬化などにおいて重要な役割
20 を果たしている。したがって、P D G F シグナルを制御することはこれら疾患の治療薬となることが期待されている。実際には、治療薬として P D G F の発現抑制剤 (例えば、特開平 10-59850 号公報参照) や、P D G F と P D G F 受容体 α との結合阻
害剤 (例えば、特表平 8-500010 号公報参照) や、P D G
25 F 受容体 α のチロシンキナーゼ阻害剤 (例えば、特表 2002-514228 号公報参照) が提案されている。

しかしながら、これらの抑制剤や阻害剤は癌特異的な P D G F シグナルだけではなく、正常な P D G F シグナルにも影響を与える恐れがある。そこで、本発明は癌細胞に特異的な P D G F シグ

2

ナルだけを選択的に抑制できる発現抑制方法に用いるためのポリヌクレオチド、発現抑制物質、発現抑制剤、及び癌の治療剤を提供することを目的とする。

5. 発明の開示

本発明にかかるポリヌクレオチドは、配列番号 2 に示される塩基配列、又はその一部を有することを特徴とする。配列番号 2 に示される塩基配列の一部を有するポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 1 に示される塩基配列を有するものが挙げられる。

10 また、本発明にかかるポリヌクレオチドは、配列番号 2 に示される塩基配列において、1 個若しくは数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、PDGF 受容体 α 遺伝子のセンス鎖の塩基配列に含まれる塩基配列、又はその一部を有することを特徴とする。

ここで、「PDGF 受容体 α 遺伝子」とは、GenBank アクセッション番号 AC026580 及び AC025013 に示される塩基配列により構成されているもの及びそのホモログをいう。

さらに、本発明にかかるポリヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチドと相補的な塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチドであってもよい。

20 これらのポリヌクレオチドは、2 本鎖 DNA、1 本鎖 DNA、2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA のいずれであってもよい。また、1 個若しくは数個の塩基の欠失、置換、若しくは付加等の遺伝的多型 (genetic polymorphism) をもち、PDGF 受容体 α 遺伝子のセンス鎖の塩基配列に含まれる塩基配列を有するポリペプチド
25 も本発明の範囲内であるが、同等の機能をもつものが好ましく、E2F-1 により転写調節されるものが特に好ましい。

本発明の PDGF 受容体 α の発現抑制方法は、PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β を含む mRNA を標的とすることを特徴とする。ここで、「mRNA」とは、転写され

てできた hnRNA からイントロン部分が除去され、エキソン部分が結合して形成された RNA をいう。また、「mRNA を標的とする」とは、直接的又は間接的に、特異的に該 mRNA から、そのコードされるタンパク質を生成しないようにすることをいう。なお、「タンパク質の発現」とは、DNA 上の遺伝情報が mRNA から正確に翻訳されてタンパク質を産生することを意味する。

本発明の PDGF 受容体 α の発現抑制方法は、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又は RNAi を用いた方法であってもよい。

ここで、「PDGF 受容体 α 遺伝子のアンチセンスヌクレオチド」とは、PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA の塩基配列に対し相補的なヌクレオチドをいい、アンチセンス RNA 又はアンチセンス DNA であってもよく、ヌクレオチドが修飾されていてもよい。上記アンチセンス RNA 又は DNA は、対象となる遺伝子から転写される mRNA の配列に対し相補的な RNA 又は DNA をいい、細胞内での遺伝情報の発現を遮断し、目的とするタンパク質への産生を特異的に抑制するために用いられる。

「リボザイム」とは、酵素活性をもつ RNA の総称であり、生物由来の RNA を特異的に切断する酵素をいう。細胞内に取り込まれると標的 RNA 配列を切断する機能を有する。その結果として標的 RNA からのタンパク質の発現が抑制される。標的 RNA 配列に対する特異性が高いため、タンパク質の発現抑制物質としては好ましい。リボザイムには、ハンマーヘッド型リボザイムや、ヘアピン型リボザイム (hairpin ribozyme) などが含まれる。

「マキシザイム」とは、一般的に WO 99/46388 号公報の明細書に記載のように、二量体の構造を形成する RNA 分子であって、例えば、その 2 本の RNA 分子が、正常細胞における mRNA を認識しないで、癌細胞に特異的な mRNA を認識するよ

うにマキシザイムを構成することにより、癌細胞に特異的な mRNA のみを切断することができる。

「RNAi」とは、RNA干渉 (RNA interference) と称される現象を誘導する二重鎖 RNA (dsRNA) を利用した方法という。「RNA干渉と称される現象」とは、上記二重鎖 RNA を細胞内に導入すると標的となる遺伝子の発現が抑制される現象であり、現在、ホストの内在する機構により 21 ~ 23 塩基対に短く切断され、短く切断された RNA 分子はホストの遺伝子から転写される mRNA を認識して配列特異的に分解し、その結果としてホストの遺伝子がコードするタンパク質の発現を特異的に抑制するためとされている。

本発明の PDGF 受容体 α の発現抑制方法は、アンチセンス RNA、リボザイム、マキシザイム、又は RNAi のいずれかをコードする DNA を用いた方法であってもよい。

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制物質は、PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β を含む mRNA を標的とすることを特徴とする。それは、例えば、発現抑制物質が該 mRNA に結合したり、該 mRNA を分解したりすることによるが、発現抑制物質が間接的に、他の物質を該 mRNA に結合させたり、他の物質により該 mRNA を分解したりしてもよい。なお、「PDGF 受容体 α の発現抑制物質」とは、PDGF 受容体 α 遺伝子からの PDGF 受容体 α タンパク質の産生を抑制する物質をいう。

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制物質としては、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又は RNAi など具体的に挙げることができる。

本発明にかかる PDGF 受容体 α の発現抑制物質としては、アンチセンス RNA、リボザイム、マキシザイム、又は RNAi のいずれかをコードする DNA など具体的に挙げることができ

る。

本発明にかかる P D G F 受容体 α の発現抑制剤は、前記発現抑制物質を有効成分とすることを特徴とする。

5 本発明にかかる癌の治療薬は、前記発現抑制剤を含有することを特徴とする。

本発明にかかる癌の治療方法は、前記発現抑制剤を含有することを特徴とする。

図面の簡単な説明

10 図 1 は、本発明の実施例 2 において、R T - P C R を用いて調べた P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 $\beta \sim 4$ の発現パターンを示す図である。

図 2 は、リボザイムにおける構造を示す図である。

図 3 は、マキシザイムにおける構造を示す図である。

15 図 4 は、本発明の実施例 1 において、- 1 3 9 5 から + 3 1 2 までの塩基配列を含むレポーターコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。なお、図中の「+」は - 1 3 9 5 から + 3 1 2 までの塩基配列を含むレポーターコンストラクトを 1 0 0 n g 導入した結果を示し、「-」は、- 1
20 3 9 5 から + 3 1 2 までの塩基配列を含まないレポーターコンストラクトを 1 0 0 n g 導入した結果を示す。

図 5 は、本発明の実施例 1 において、- 5 1 7 から + 1 4 4 5 までの塩基配列を含むレポーターコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。

25 図 6 は、本発明の実施例 1 において、転写開始点を欠失した様々な長さの deletion mutant を用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す図である。

図 7 は、基本転写因子により転写される P D G F R α の m R N A と、E 2 F - 1 により転写される P D G F R α の m R N A の概

略を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

癌細胞においては、ほとんどの場合、R B タンパク質などの癌抑制タンパク質が関与するシグナル伝達経路に異常が起きていることが知られている。例えば、R B タンパク質の上流で働くサイクリンD 1 の過剰発現は、増殖因子に対する感受性を亢進させることにより、癌細胞の悪性化に寄与すると考えられている。in vitro での細胞培養系では、サイクリンD 1 を過剰発現させた細胞株にF G F (fibroblast growth factor; 繊維芽細胞増殖因子)を加えることにより、その細胞は悪性化する。本願発明者は、P D G F (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子)も同様の働きをする、即ちサイクリンD 1 を過剰発現させた細胞株を悪性化させることを見いだした。

サイクリンD 1 - R B 経路の下流には、転写因子E 2 F - 1 が存在し、F G F 受容体の発現を亢進することにより、F G F に対する感受性を亢進させる。実施例で詳細に後述するように、E 2 F - 1 はP D G F 受容体 α の発現も亢進するが、本願発明者は、従来知られているプロモーターに作用するのではなく、従来のイントロン1中に新たなE 2 F - 1 によって制御される新規プロモーター領域を見だし、その新規プロモーターによって転写される際に用いられる新規エキソン1 β を同定した。

このように、E 2 F - 1 とP D G F が関与する癌の悪性化において、これらの因子のターゲットの一つは、P D G F 受容体 α のエキソン1 β を有するm R N Aであることが明らかになった。従って、このエキソン1 β を有する転写産物からのP D G F 受容体 α の産生を特異的に阻害することにより、癌細胞の悪性化につながるシグナル経路を断つことができ、癌細胞の増殖を抑制できる。なお、サイクリンD 1 - E 2 F - 1 経路に限らず、癌細胞の増殖

が、エキソン 1 β を有する mRNA を過剰に転写させることにより、PDGF 受容体 α と共同して癌の悪性をひきおこす因子によるのであれば、その癌細胞の増殖阻害に本発明を適用できる。

以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施
5 例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989);
F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G.
10 Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコール
15 を用いる。

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

25 配列番号 2 に示されるヒト PDGF 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β の塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチドは、配列番号 2 に示される塩基配列情報に基づき、cDNA ライブラリーやゲノムライブラリーなどのヒト遺伝子ライブラリーから調製することができる。また、マウス、ラット、ニワトリ、ブタ、

イヌ、サルなどヒト以外の生物種由来のPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β もE2F-1によって転写制御されることで特定されるが、例えば、ヒトPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β とのハイブリダイゼーションや、従来のイントロン1中の配列
5 のうち新たなエキソンを調べることなどによっても同定でき、これらも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

ここで、「ヒトPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 」とは、配列番号2に示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含んで構成されているエキソンをいい、「PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β 」とは、配列番号2に示される塩基配列を有する
10 ポリヌクレオチドを含んで構成されているエキソン及びヒト以外の生物種においてそれに対応するエキソンをいう。

PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β は、mRNA上の非翻訳領域であるため、ヒト以外の生物種において、必ずしも塩基配列のレベルで高い相同性を有する必要はなく、特定の細胞種で転写されるという機能的な面は保存されている必要があり、例えば、
15 E2F-1によって転写が制御されるというもう一方のエキソン1に見られない特徴を必要とする。

図1に示すように、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうち
20 エキソン1 β を含むmRNAは、特定の癌細胞にしか検出されない。従って、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とした発現抑制方法、並びに本発明のポリヌクレオチド、発現抑制物質、及び発現抑制剤などは、特定の癌細胞（例えば、ヒト大腸癌細胞SW480やヒト食道癌細胞
25 T T nなどを具体的に挙げることができる。）を攻撃するための癌の治療方法や癌の治療剤として有用である。

本発明における発現抑制方法としては、PDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうちエキソン1 β を含むmRNAを標的とするものであって、例えばPDGF受容体 α 遺伝子のmRNAのうち

エキソン 1 β を含む mRNA に結合し、翻訳を抑制して PDGF 受容体 α の発現を抑制する方法や、上記 mRNA を分解又は切断して PDGF 受容体 α の発現を抑制する方法であってもよい。以下にアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又は RNAi などの発現抑制物質を用いた発現抑制方法について例を挙げて説明する。

(1) アンチセンスヌクレオチドの調製

本発明の発現抑制方法に用いるアンチセンスヌクレオチドとしては、PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β に対応する部分の塩基配列又はその一部に相補的な塩基配列を含むアンチセンス RNA 又はアンチセンス DNA を具体的に例示することができる。また、15～30 の塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。

本発明のアンチセンスヌクレオチドは、構造上、その配列の位置、長さ、修飾化、ミスマッチの存在等には制限されるものではない。上記修飾したアンチセンスヌクレオチドとしては、体内又は細胞内においてアンチセンスヌクレオチドを安定化させるために、ホスホジエステル結合のリン酸基の酸素原子の一つを硫黄原子又はメチル基に修飾したアンチセンスヌクレオチドや、モルフォリノ (morpholino) で修飾したアンチセンスヌクレオチドを具体的に例示することができる。

本発明のアンチセンス DNA は、S1 ヌクレアーゼなどの DNA 依存性 DNA ポリメラーゼを用いて、プライマー・エクステンション法により *in vitro* で合成できる。また、アンチセンス鎖の一部をプライマーとして PCR を行うことにより、アンチセンス鎖だけを合成することができる。また、DNA 合成機を用いることなどによって、人工的に合成してもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成もアンチセンス DNA に準じるが、人工的に合成するのが最も好ましい。

一方、本発明のアンチセンスRNAは、例えば、RNA合成機や固相合成法などにより容易に合成することができる。その後、HPLCを用いてNH₃OH/EtOHで溶出することにより、目的のRNAを単離することができる。

5 本発明のアンチセンスRNAは、このように人工的に合成してもよいが、T7RNAポリメラーゼが特異的に認識するプロモーター配列（5'-TAATACGACTCACTATA-3'：配列番号3）の下流に、アンチセンスRNAに対応するDNA配列をもつ2重鎖DNAを挿入したベクターを作製し、T7RNAポリメラーゼを用いて
10 in vitro 転写系によって合成してもよい。

また、アンチセンスRNAに対応するDNAを組み込んだウイルスベクター又はプラスミドなどの発現ベクターを用いてアンチセンスRNAを細胞内で発現させてもよい。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクター
15 などであってもよい。

（2）リボザイムを挿入したプラスミドの調製

リボザイムは、図2に示すように、標的のmRNAの塩基配列に相補的な塩基配列（リボザイムの5'末端部分と3'末端部分の塩基配列を示す。）と、触媒活性部位（○印で示した塩基）を
20 有する24の塩基配列とを有する。リボザイムの5'末端部分と3'末端部分の塩基配列が標的のmRNAの塩基配列と特異的に結合すると、mRNA上にあるNUX配列（Nは任意の塩基であって、Xはa、u、cのいずれかの塩基を意味する。）で切断して標的のmRNAを分解させることができる。すなわち、PD
25 GF受容体α遺伝子のmRNAのうちエキソン1βに対応する部分の塩基配列を基にリボザイムを合成して細胞内に投与すれば、PDGF受容体α遺伝子のmRNAのうちエキソン1βを含むmRNAを特異的に切断することができると考えられる。

従って、本発明の発現抑制物質であるリボザイムは、配列番号

2 に示されるヒト P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β の塩基配列から、N U X 配列に対応する配列を選択してその配列を含む 1 5 ~ 2 0 の塩基配列に相補的な塩基配列と、触媒活性部位 (○印で示した塩基) を有する 2 4 の塩基配列とを含むようにすればよい。N U X 配列に対応する配列としては、例えば、配列番号 2 に示される 3 4 ~ 3 6 番目の G T C や、7 5 ~ 7 7 番目の G T C や、7 8 ~ 8 0 番目の G T C や、8 1 ~ 8 3 番目の G T C や、1 7 2 ~ 1 7 4 番目の G T C や、2 6 7 ~ 2 6 9 番目の G T C を挙げることができる。なお、上記リボザイムは、ハンマーヘッド型リボザイムや、ヘアピン型リボザイム (hairpin ribozyme) であつてもよい。

実際の合成方法は、人工合成、in vitro 合成、発現ベクターによる細胞内合成などがあり、(1) のアンチセンス R N A の場合と同様なので、ここでは説明は省略する。

15 (3) マキシザイムの設計及び調製

マキシザイムは、図 3 に示すように、二量体の構造を形成する R N A 分子からなり、両方の R N A 分子には標的 R N A を特異的に認識するセンサー部位 (図中に X . . . X の部分を示し、X は任意の塩基を意味する。なお、上段の X と下段の X はそれぞれ相補性の塩基を意味する。) と、触媒活性部位 (図中において二重鎖を形成しない部分を示す。) と、標的 R N A を含む m R N A 上にある N U X 配列 (N は任意の塩基であつて、X は A、U、C のいずれかの塩基を意味する。図中においては G U C 配列の部分を示す。) 及びその上流 (図中においては G U C 配列の部分の上流を示す。) 又は下流 (図中においては G U C 配列の部分の下流を示す。) を認識する部位を有する。マキシザイムのセンサー部位が標的 R N A を特異的に認識して結合し、また、マキシザイムのもう一方の部分が標的 R N A を含む m R N A 上にある N U X 配列の上流及び下流を特異的に認識して結合すると、標的 R N A を

含む mRNA 上にある N U X 配列を切断して標的の mRNA を特異的に分解することができる。すなわち、P D G F 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β に対応する部分の塩基配列を基にマキシザイムを合成して細胞内に投与すれば、P D G F 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β を含む mRNA を特異的に切断することができると考えられる。

例えば、P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β を標的 RNA として、その標的 RNA に相補的な塩基配列をセンサー部位とする。また、標的 RNA の下流に存在する N U X 配列を P D G F 受容体 α の mRNA から選択して、N U X 配列の上流と下流の配列に相補的な塩基配列を決定する。N U X 配列は、P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β の mRNA 上のものであってもよい。これらの情報から、マキシザイムの各 RNA 分子を RNA 合成機に合成することにより、マキシザイムを作製することができる。なお、図中の X の領域は 1 又は数個の増減があってもよい。

実際の合成方法は、人工合成、in vitro 合成、発現ベクターによる細胞内合成などがあり、(1) のアンチセンス RNA の場合と同様なので、ここでは説明は省略する。ただし、マキシザイムは 2 分子の RNA を用いるため、発現ベクターを用いて細胞内で発現させる場合、2 分子の RNA を一つのベクターに組み込んでも、二つのベクターに別々に組み込んでも構わない。

(4) RNA i の調製

目的の遺伝子に対応する二重鎖 RNA が生体内に導入されると、対応する mRNA が分解するという報告がある (Bass, B. L. (2000) Cell 101, 235-238、Fire, A. (1999) Trends Genet. 15, 358-363、Sharp, P. A. (2001) Genes Dev. 15, 485-490)。従って、P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β 、又はその一部を有する mRNA に対応する二重鎖 RNA (RNA i) を細胞内又は生体内に導入すれば、P D G F 受容体 α 遺伝子の mRNA のうち

エキソン 1 β を含む mRNA が分解されると考えられる。

本発明の発現抑制物質である RNA i は以下のように調製することができる。PDGF 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β のセンス鎖、又はその一部の塩基配列に対応する RNA と、その RNA
5 に相補的な RNA とを、RNA 合成機を用いて人工的に合成することができる。また、HiScribe RNAi Transcription Kit (NEB 社製) を用いて、in vitro 及び in vivo で合成してもよい。

その他、PDGF 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β 又はその一部を正と負の両方向にクローニングしたウイルスベクター又はプラスミドなどの発現ベクターをそれぞれ細胞内に導入し、DNA
10 の両鎖を細胞内で発現させることによって、細胞内で RNA i ができるようにし、標的の mRNA を分解させるようにしてもよい。また、PDGF 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β 又はその一部に対応する二重鎖の各鎖の DNA 配列を融合した配列を持つ DNA、
15 すなわち、センス鎖の DNA の 3' 末端とアンチセンス鎖の DNA の 5' 末端を融合させた配列を持つ DNA、又は相補的な DNA の 3' 末端とセンス鎖の DNA の 5' 末端を融合させた配列を持つ DNA を発現ベクターに組み込んだものを用いてもよい。
上記ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター又はレ
20 トロウイルスベクターなどであってもよい。なお、これらの RNA i は 30 ベース以内のものが望ましく、21 ベースが最も望ましい。

(5) 発現抑制物質の導入

in vitro の細胞培養系において発現抑制物質を細胞内へ導入
25 する際、調製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNA i などの発現抑制物質を、対象の癌細胞に対し、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフエクション法、アデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターなどを用いたウイルス感染法、又はカルシウムを用いた

トランスフェクション法等を用いる。

一方、*in vivo*で行う発現抑制剤の個体への導入方法としては、前記調製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNAiなどの発現抑制物質を有効成分とする発現抑制剤を、ヒトまたはヒト以外の脊椎動物において、導入対象の癌細胞の近傍に直接投与するか、発現抑制剤によっては非経口、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、又は腹腔内に投与する方法であってもよい。この場合発現抑制剤は、使用する部位又は目的に応じて、薬理学的に許容された適切な賦形剤又は基剤をさらに含有してもよい。

個体に投与する発現抑制剤としては、発現抑制物質が細胞内に取り込まれやすいように調製されているものが好ましい。例えば、前記アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNAiをコードするDNAをウイルスベクターに組み込んだ発現ベクターを*in vitro*で適当な細胞株に感染させ、ウイルスを産生し、そのウイルスを注射(inject)して感染させる方法であってもよい。ウイルスベクターとしては、細胞内で発現するアデノウイルスベクターや、レトロウイルスベクターを用いてもよい。

また、前記発現ベクターをリポソームの中に入れて癌細胞と融合されることによって、プラスミドを細胞内に導入させてもよい。また、TransIT In Vivo Gene Delivery System (TaKaRaの商品名)を用いて、*in vivo*トランスフェクションを行ってもよい。この場合、発現抑制剤は、患部に直接注射しても、静脈注射してもよい。

また、前記調製したアンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、RNAiなどのRNAを、*in vitro* selection法により細胞内に導入されやすいHIVのTATなどのペプチドと結合させたRNAアプタマーを発現抑制剤として注射してもよい。

対象の癌細胞としては、ヒト大腸癌細胞 S W 4 8 0 やヒト食道癌細胞 T T n を具体的に例示することができるが、P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β から転写される m R N A が確認できる癌細胞であれば、どのようなものでもよい。

5 (6) 発現抑制物質による発現抑制の評価

前記 (5) 記載の方法により、in vitro で培養された特定の癌細胞に発現抑制物質を導入したものと、導入していないものについて、R T - P C R 法により P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β から転写された m R N A の量を比較評価することにより、
10 発現抑制物質による発現抑制の評価を行うことができる。その他、ノザン・ブロッティング法などにより P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β から転写された m R N A の量を評価する方法であってもよい。この結果を用いて、P D G F 受容体 α 遺伝子のエキソン 1 β から転写された m R N A の翻訳をより有効に抑制する
15 ことができるアンチセンスヌクレオチドが見出せる。

上記は in vitro による実験であるが、in vivo における実験においても評価することが可能である。

in vivo での評価方法としては、以下の方法を具体的に例示することができる。正常マウスに前記特定の癌細胞を皮下注射し、
20 一定期間において腫瘍を拡大させ、その後、(5) の導入方法により前記調製した発現抑制剤を 1 ～ 数回投与する。投与後、発現抑制剤を導入したマウスと、導入していないマウスとの癌の大きさや生存率を比較評価することにより、発現抑制物質による発現抑制の評価を行うことができる。

25 以下、本発明の実施例について詳細に述べる。

< 実施例 1 >

本実施例では、P D G F 受容体 α 遺伝子において、転写因子 E 2 F - 1 により制御されている新規エキソンを同定した。

まず、本願発明者は、マウス N I H 3 T 3 細胞が P D G F の添

加によって、足場に非依存的に増殖することを見いだした。そこで、これらの細胞株において、PDGF受容体 α (PDGFR- α) の発現を調べたところ、PDGF受容体 α の発現は上昇し、これが転写レベルでの制御であることが明らかになった。

5 サイクリンD1は、細胞周期依存的にpRbのリン酸化を介して転写因子E2F-1を活性化するため、この上昇が、E2F-1によるヒトPDGF受容体 α のプロモーターの調節のためであるかどうか調べた。転写開始点の-1395から+312までの配列 (Genomics, Vol.30, 224-232, 1995 に報告されている転写開始点をもとに塩基の番号付けをした。GenBank アクセッション番号D50001S01参照) からなるプロモーター領域を、pGL3ルシフェラーゼベクターを用いてルシフェラーゼ遺伝子の上流にクローニングし、サイクリンD1を過剰発現させたNIH3T3細胞に、E2F-1の発現ベクターと共にトランスフ
10 エクションによって導入した。24-72時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行い、上記プロモーターによる転写活性を調べた。ポジティブ・コントロールとしては、mFGFR-1のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを用いた。その結果、mFGFR-1プロモーターの転写活
15 性は上昇するものの、PDGF受容体 α のプロモーターの転写活性は上昇しなかった (図4)。従って、従来知られていたPDGF受容体 α のプロモーターは、サイクリンD1を過剰発現させたマウスNIH3T3細胞におけるPDGF受容体 α の発現の上昇に関与していないことがわかった。

25 そこで、転写因子結合配列検索 (TF search) により、ヒトPDGFR- α 遺伝子のエキソン1下流にE2F-1と結合するコンセンサス配列があるか否かを調べたところ、E2F-1が結合すると考えられる配列が、報告された転写開始点の下流約1 kb付近に4ヶ所かたまって存在することがわかった。そこで-

295 から +1445 までの塩基配列からなる DNA を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に結合し、得られたレポーターコンストラクトを用いて前記記載の方法と同様にルシフェラーゼアッセイを行い、E2F-1 による転写活性を調べた。その結果、この領域の転写活性は E2F-1 によって上昇することが確認できた (図 5)。さらに、E2F-1 の転写活性化能を欠失させた変異 E2F-1 (1 から 368 までのアミノ酸配列)、あるいは 132 番目のロイシンをグルタミン酸に置換して DNA 結合能を欠失させた変異 E2F-1 では、転写活性が見られないことから、この領域が実際に E2F-1 によって制御されていることが示唆された。

しかし、推定される E2F-1 結合サイトは報告されている転写開始点の約 1.2 kb p 下流に存在し、このプロモーター活性が従来報告されていた転写開始点に作用するとは考えにくい。そこで、この領域が従来報告されている転写開始点に働いているかどうかを調べるために、この転写開始点を欠失した様々な長さの deletion mutant を作製して、上記の方法と同様にルシフェラーゼアッセイを行い、E2F-1 による転写活性を調べた。その結果、転写開始点の下流約 1 kb p まで欠失させたコンストラクトでもプロモーター活性を有し、さらに E2F-1 による転写活性の上昇も見られた。これらのことから、PDGFR- α の E2F-1 で制御される mRNA は、新たな転写開始点から発現する可能性が示唆された (図 6)。

そこで、E2F-1 による転写開始点の決定を 5' - RACE 法により行った。-295 から +1445 までの塩基配列からなる DNA を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に結合したレポーターコンストラクトをトランスフェクションによって導入した NIH3T3 細胞株から mRNA を抽出し、5' - Full RACE Core Set (TaKaRa の商品名) を用い、ルシフェラーゼ遺伝子配列に特異的

なプライマー[フォワードプライマー1 (配列番号4: 5' -CCTTAATTAAGGGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTA-3') と、リバープライマー1 (配列番号5: 5' -CCTTAATTAAGGGGCGCAACTGCAACTCCGATAAA T-3') を用いてPCRを行なったところ、増幅産物が得られた。

- 5 そこで、この増幅産物のDNA配列を調べた結果、従来イントロンだと思われていた領域に、新規エキソンの存在が見出された。このようにして、従来イントロンと思われていた領域に、E2F-1によって転写制御される新規エキソンが存在することが明らかになった。

10 <実施例2>

本実施例では、PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β が癌細胞において特異的に発現しているかどうかを確認した。

- PDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β と既知のエキソン4の配列からプライマー[フォワードプライマー2 (配列番号6: 15 5' -CCTTAATTAAGGAACCGCACACCAAGGGGCCCTCATT-3') と、リバープライマー2 (配列番号7: 5' -AACAGCACAGGTGACCACAATCG-3')]を設計し、図1に示される各癌細胞から抽出した全RNAを用いてRT-PCR法を行った。図1に示されるように、ヒト大腸癌細胞SW480とヒト食道癌細胞TTnにおいてシグナルが検出された。そこで、これらの増幅バンドを回収し、DNA配列を調べた結果、これらのバンドがPDGF受容体 α 遺伝子のエキソン1 β と既知のエキソン2~4の配列が連結したヒトPDGFR- α のmRNA断片であることがわかり、同時に配列番号 20 1に示される全長338bpのエキソン1 β の配列を決定した。すなわち、新たに見出されたプロモーター領域はヒトPDGFRのmRNA 2のものであることがわかった (図7)。

25 <実施例3>

エキソン1 β の5'末端のより正確な位置を5' -RACE法により検討を行った。エキソン1 β を含むPDGFR- α m

R N A を発現しているヒト骨肉腫細胞 M G - 6 3 から m R N A を抽出し、5' - Full RACE Core Set を用い、エキソン 1 β に特異的なプライマー [フォーワードプライマー 2 (配列番号 6) と、リバープライマー 3 (配列番号 8 : 5' - CCGCTCGAGGCGACGACGACT TCTTCACTCAGG-3')] を用いて P C R を行った。この P C R により得られた増幅産物の D N A 配列を決定した結果、配列番号 2 に示される 3 6 3 b p の塩基配列が得られ、エキソン 1 β の 5' 末端が少なくとも + 1 2 1 0 まで伸びていることが明らかになった。

10

産業上の利用の可能性

以上のように、本発明によると、癌特異的な P D G F シグナルだけを選択的に抑制できる発現抑制方法に用いられるためのポリヌクレオチド、発現抑制物質、発現抑制剤、及び癌の治療剤を提供することができる。

15

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 2 に示される塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチド。
- 5 2. 配列番号 2 に示される塩基配列において、1 個若しくは数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加され、PDGF 受容体 α 遺伝子のセンス鎖の塩基配列に含まれる塩基配列、又はその一部を有するポリヌクレオチド。
3. 請求項 1 又は 2 に記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基
10 配列、又はその一部を有するポリヌクレオチド。
4. PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β を含む mRNA を標的とすることを特徴とする PDGF 受容体 α の発現抑制方法。
5. アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、
15 又は RNA i を用いることを特徴とする請求項 4 記載の PDGF 受容体 α の発現抑制方法。
6. アンチセンス RNA、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i のいずれかをコードする DNA を用いることを特徴とする請求項 4 記載の PDGF 受容体 α の発現抑制方法。
- 20 7. PDGF 受容体 α 遺伝子の mRNA のうちエキソン 1 β を含む mRNA を標的とすることを特徴とする PDGF 受容体 α の発現抑制物質。
8. アンチセンスヌクレオチド、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i であることを特徴とする請求項 7 記載の PDGF
25 受容体 α の発現抑制物質。
9. アンチセンス RNA、リボザイム、マキシザイム、又は RNA i のいずれかをコードする DNA であることを特徴とする請求項 7 記載の PDGF 受容体 α の発現抑制物質。
10. 請求項 7 に記載の発現抑制物質を有効成分とすることを

21

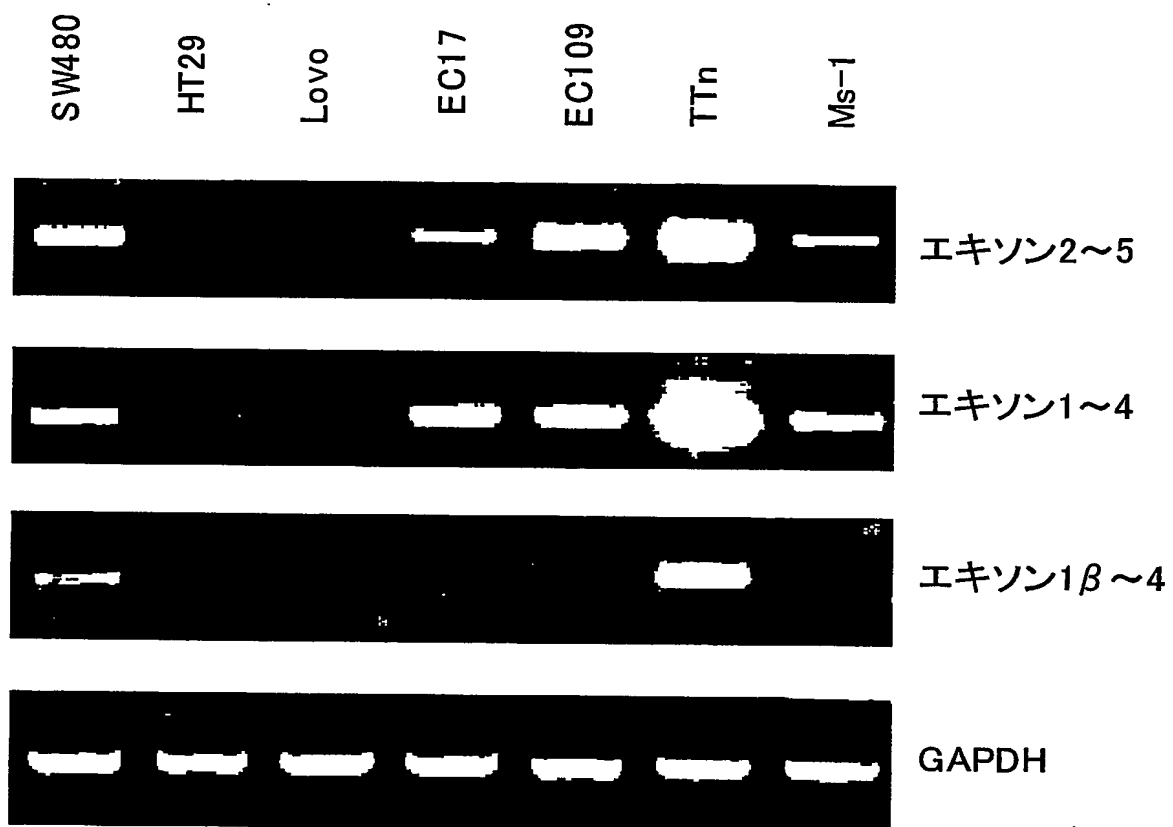
特徴とする P D G F 受容体 α の発現抑制剤。

1 1 . 請求項 1 0 に記載の発現抑制剤を含有することを特徴とする癌の治療剤。

1 2 . 請求項 1 0 に記載の発現抑制剤を用いることを特徴とする癌の治療方法。

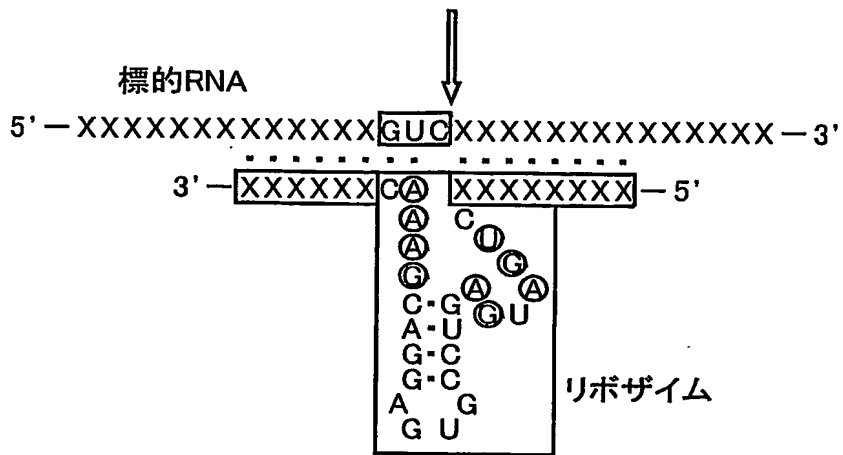
5

1/6

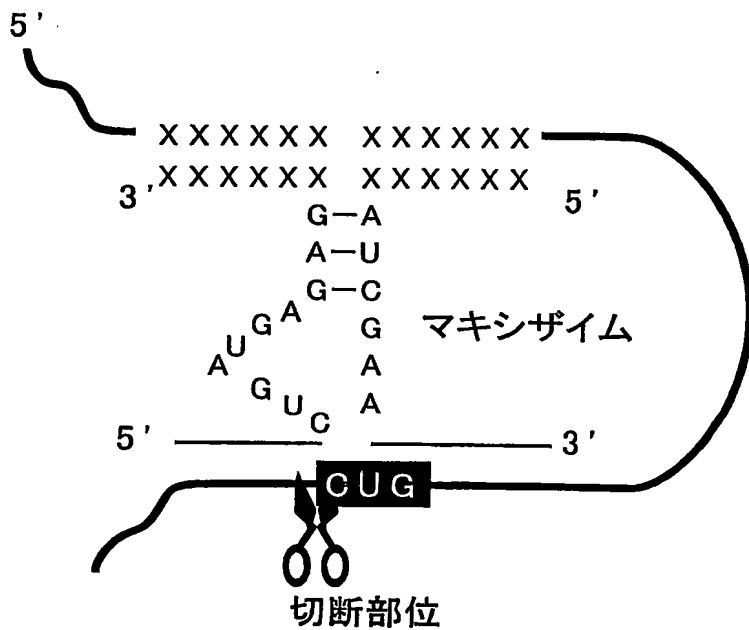


第 1 図

2/6

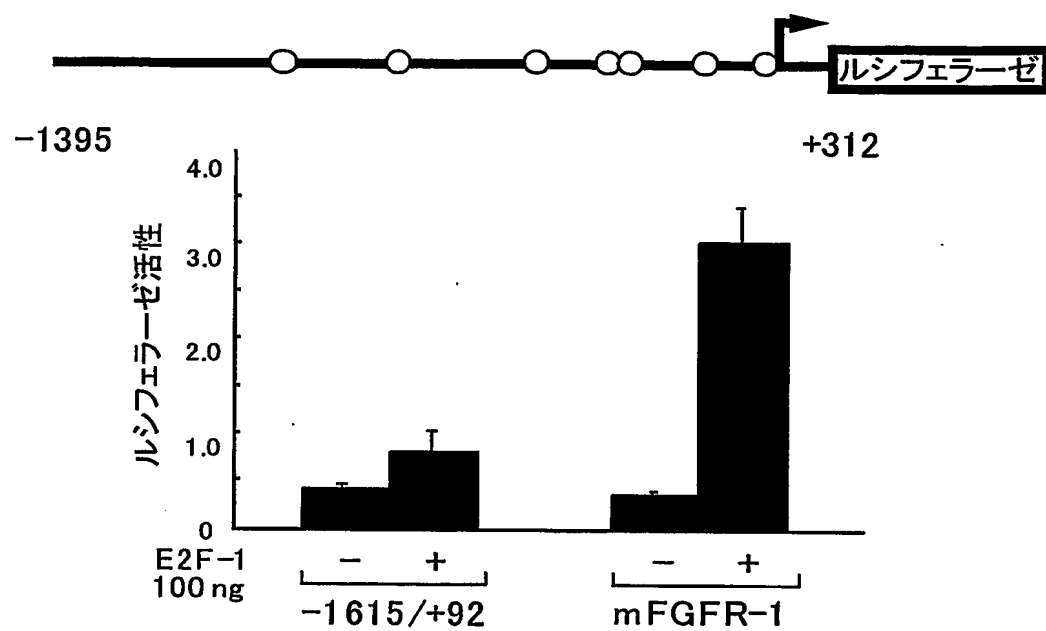


第 2 図

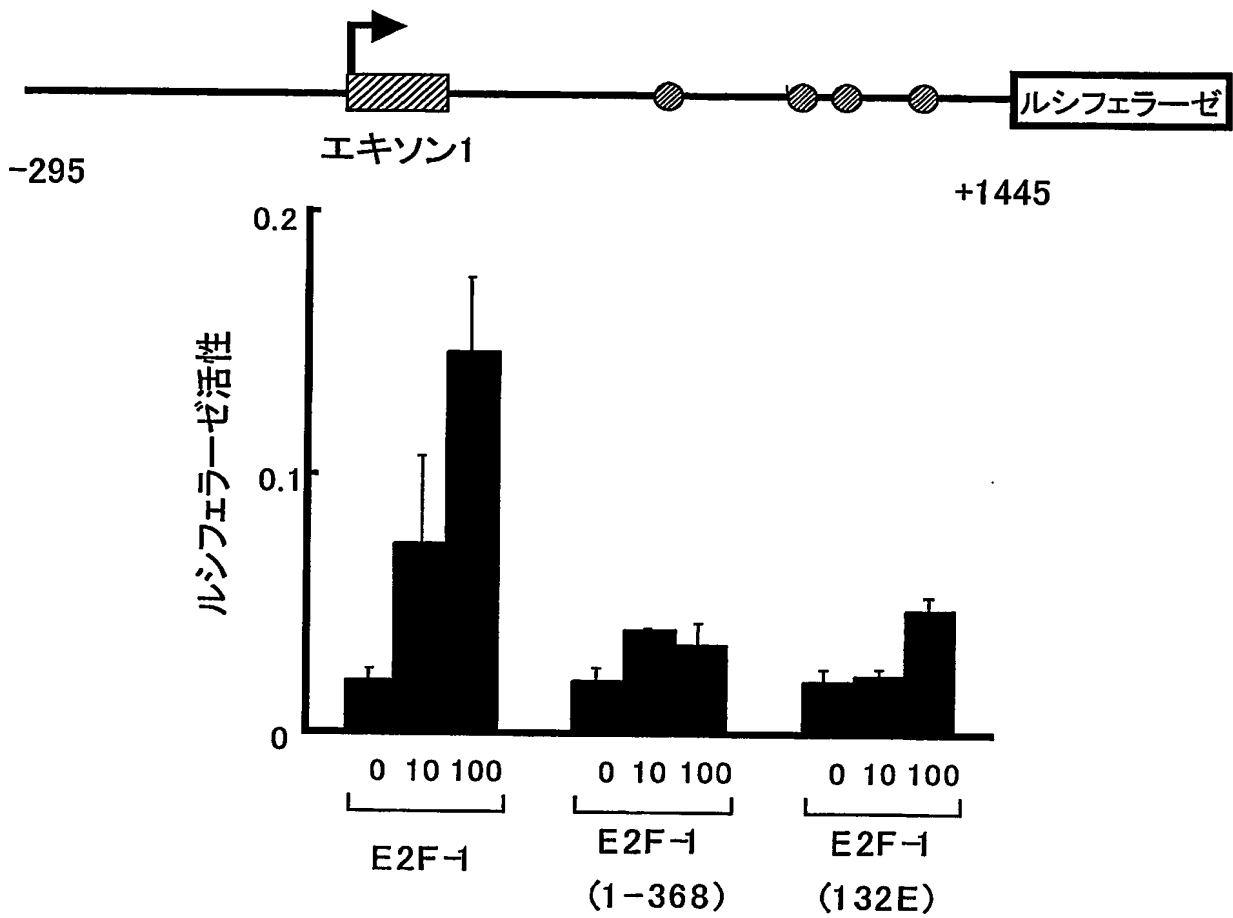


第 3 図

3/6

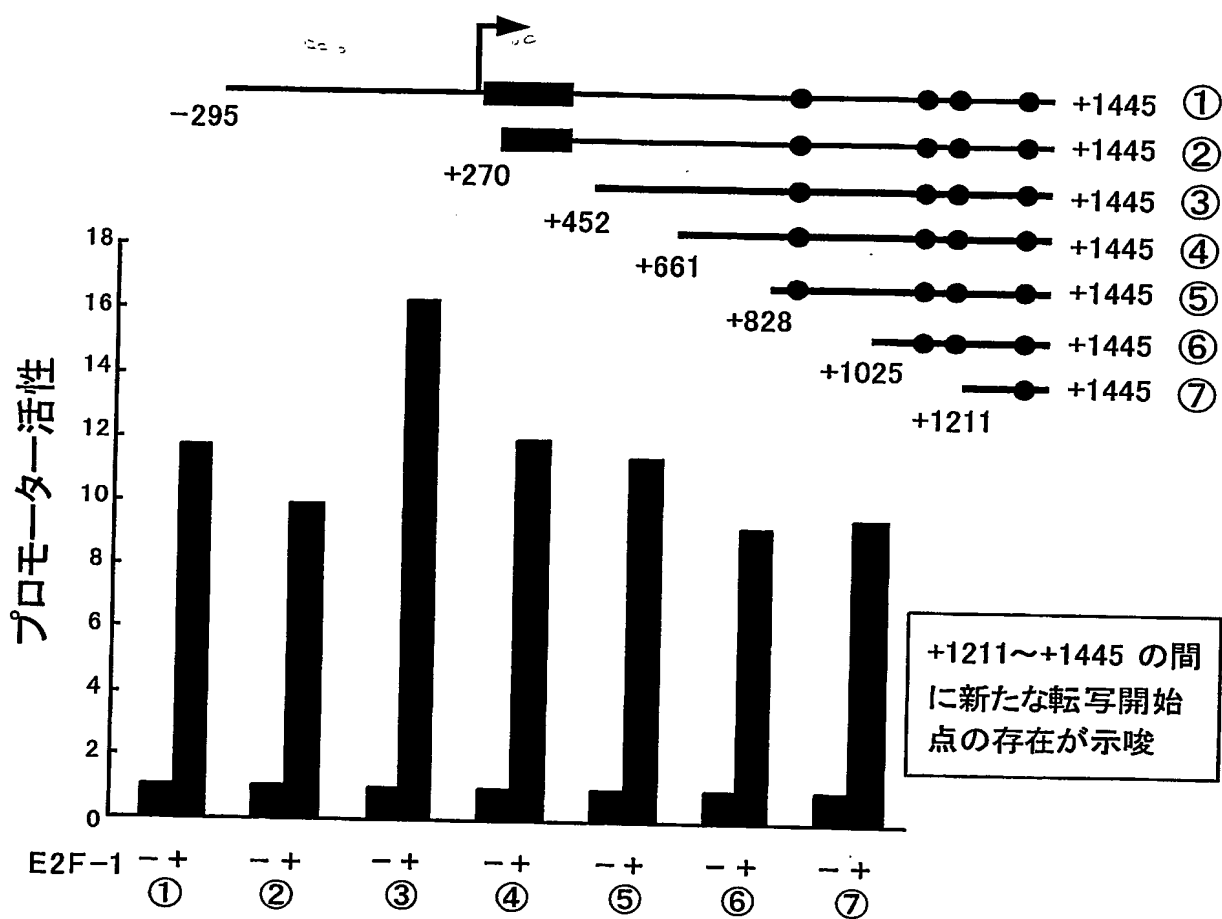


第 4 図



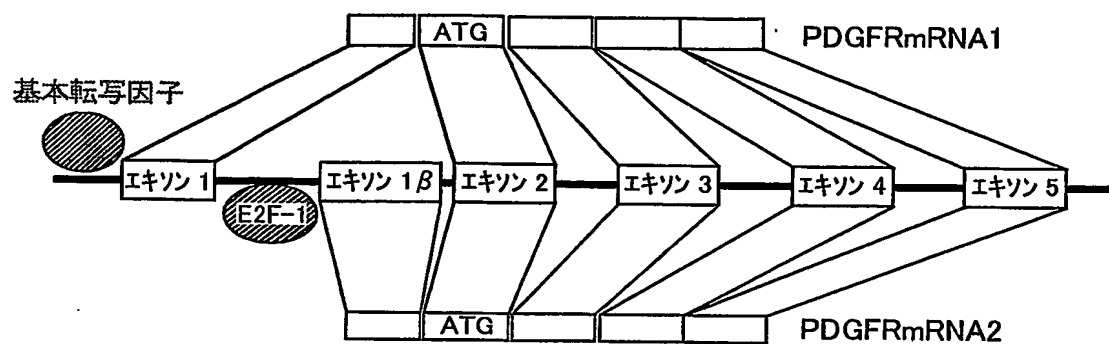
第 5 図

5/6



第 6 図

6/6



第 7 図

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> PDGF receptor alpha gene exon1 beta and its use

<130> PCT/711

<150> JP 02/332142

<151> 2002-11-15

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Imoto, Masaya

Inventor: Minato, Yusuke

Inventor: Tashiro, Etsu

<400> 1

gcgcgggggc gacagcggcg gcgcggggcgg gcgggtctgga ataatgacaa acacatttgg 60

ccctgagtga agaagtcgtc gtcgcctcgc attccagcaa ctgggatttg aggaatttcg 120

aaccgcacac caaggggccc tcattgtgct ccgtggcccc cgcccccgcc cgtcttcccg 180
cgccccctcc tcggtggaat catttctgca ttgcccgggg gctctgcttt cgctcagttc 240
tggccgcagg caggaagaga ggaaaggctt ccaggaaggt gccgaacttc ttgtgaggaa 300
gttagggacg acttggaact ggggaaactt gtttgacg 338

<210> 2

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cagtgtgctc gggttgcacg ccctagcgcg ggggcgacag cggcggcgcg ggcgggcggt 60
ctggaataat gacaaacaca tttggccctg agtgaagaag tcgtcgtcgc ctgcattcc 120
agcaactggg atttgaggaa tttcgaaccg cacaccaagg ggccctcatt gtgctccgtg 180
gccccgccc ccgctgtct tcccgcgccc cctcctcggt ggaatcattt ctgcattgcc 240
cgggggctct gctttcgtc agttctggcc gcaggcagga agagaggaaa ggtctccagg 300
aaggtgccga acttcttgag aggaagttag ggacgacttg gaactgggga aacttggttg 360
cag 363

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Promoter sequence

<400> 3
taatacgact cactata

17

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer 1

<400> 4
ccttaattaa gggattctcg catgccagag atccta

36

<210> 5
<211> 36
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer 1

<400> 5

ccttaattaa ggggcgcaac tgcaactccg ataaat

36

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer 2

<400> 6

ccttaattaa ggaaccgcac accaaggggc cctcatt

37

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer 2

<400> 7

aacagcacag gtgaccacaa tcg

23

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer 3

<400> 8

ccgctcgagg cgacgacgac ttcttcactc agg

33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90/14425 A1 (ZYMOGENETICS, INC.), 29 November, 1990 (29.11.90), & EP 474744 A1 & US 5371205 A & JP 4-505260 A	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 January, 2004 (06.01.04)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14528

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claim 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 90/14425 A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 1990. 11. 29 & EP 474744 A1 & US 5371205 A & JP 4-505260 A	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.01.04

国際調査報告の発送日 20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

